

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

GUILHERME DEOMEDESSE MINARI

Orientador: Leonardo Lucas Madaleno

Coorientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

**Trabalho apresentado a Faculdade de Tecnologia
de Jaboticabal - Fatec, para obtenção do título de
Tecnólogo em Biocombustíveis.**

Minari, Guilherme Deomedesse

M663a Aplicação de biocidas no controle de contaminantes bacterianos na fermentação etanólica. / Guilherme Deomedesse Minari.— Jaboticabal : Fatec, 2012.

48f.

Orientador: Leonardo Lucas Madaleno

Coorientador: Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho (graduação) – Apresentado ao Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, 2012.

1. Controle de Contaminação. 2. Lúpulo. 3. Óleo de Orégano. I. Madaleno, L. L. II. Título.

CDU 663.18:665.34

Curso de Tecnologia em Biocombustíveis

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA.

AUTOR: GUILHERME DEOMEDESSE MINARI

ORIENTADOR: PROF. DR. Leonardo Lucas Madaleno

COORIENTADORA: PROF (a).DR (a). Mariana Carina Frigieri Salaro

Trabalho de Graduação aprovado pela Banca Examinadora como parte das exigências para conclusão do Curso Superior de Tecnologia em Biocombustíveis, apresentado à FATEC-JB para a obtenção do título de Tecnólogo.

LEONARDO LUCAS MADALENO

MARIA BENINCASA VIDOTTI

RITA DE CÁSSIA VIEIRA MACRI

Data da apresentação: 21 de dezembro de 2012.

Presidente da Comissão Examinadora

Dedico aos meus pais, Cristiano e Liliane, por serem o meu maior exemplo de vida e mesmo em meio às adversidades, eles sempre estiveram ao meu lado me apoiando em todo tempo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus em primeiro lugar, pela vida, pela Sua presença e por Sua permissão, pois sem Ele nada aconteceria;

Aos meus familiares por estarem comigo nesta jornada;

Aos meus verdadeiros amigos; Diego, Herick, Ilana e a toda sala do ano de 2010 do período vespertino, pelo tempo vivido;

Ao professor Doutor Leonardo Lucas Madaleno por me conceder o privilégio de ser seu orientado;

A professora Doutora Mariana Carina Frigieri Salaro por me ajudar na construção deste trabalho;

Aos auxiliares docentes Flávia e Márcio por me ajudarem no processo de análises experimentais;

Ao Centro Paula Souza - Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC – JB) por proporcionar a disponibilidade de aprendizado.

As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.
(Paulo Beleki).

RESUMO

APLICAÇÃO DE BIOCIDAS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES BACTERIANOS NA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA

Para o controle da contaminação na fermentação etanólica são utilizados vários métodos como o uso de antibióticos e biocidas. O objetivo do presente trabalho foi comparar a aplicação de biocidas no controle de contaminantes. Para tanto, foi utilizado delineamento em blocos casualizados, com cinco repetições. Os tratamentos aplicados foram testemunha, 3 mg/L de Kamoran[®], 10 mg/L de óleo de Lúpulo, e 0,5% de óleo essencial de orégano. Foi realizada fermentação em cinco dias, sendo cada dia com uma repetição de cada tratamento. Utilizou-se de mosto proveniente de caldo de cana de usina na região de Jaboticabal-SP. Para o preparo do mosto (500 mL para cada tratamento) o caldo foi diluído para 14° Brix, o pH acertado para 4,5 e foram realizadas análises de acidez e ART. Foi utilizada levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) prensada na quantidade de 30g/L de mosto. A fermentação foi conduzida em enlarmeyers de 1L, que foram colocados em Shaker para agitação e controle de temperatura, em torno de 35° C. O valor igual ou menor do que 1° Brix foi determinado como condição para o término do processo fermentativo e foi anotado o tempo total de fermentação. No início e no final do processo fermentativo foram realizadas análises de viabilidade celular e contaminação. No vinho obtido foram realizadas as análises de acidez, ARRT, teor alcoólico e determinada a quantidade de álcool produzido e eficiência fermentativa. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). A aplicação de biocidas nas dosagens utilizadas neste estudo não foi suficiente para controlar a contaminação. Os dias de fermentação apresentaram resultados diferentes em relação ao ARRT, pH do vinho, temperatura de fermentação, contaminação inicial e final e na viabilidade final. O óleo essencial de orégano se apresentou com ação antiespumante durante a fermentação, característica que é de elevado interesse para a maior qualidade da condução das fermentações.

Palavras chave: controle de contaminação, antibióticos, lúpulo, óleo de orégano.

ABSTRACT

APPLICATION OF BIOCIDES IN THE CONTROL OF BACTERIAL CONTAMINANTS ON ETHANOL FERMENTATION

*For the contamination control in ethanol fermentation many methods are used, as the use of antibiotics and biocides. The aim of this study was to compare the application of biocides to control contaminants. For that, it was used a randomized block design, with five replications. The treatments were applied, 3 mg / L of Kamoran ®, 10 mg / L of Hops oil, and 0.5% essential oregano oil. Fermentation was carried out in five days; each day with one repetition for every treatment. It was used mash from sugar cane juice in the region of Jaboticabal, state of São Paulo. For the mash preparation (500 mL for each treatment), the sugar cane juice was diluted to 14° Brix, the pH was adjusted to 4.5 and analyses of acidity and ART were carried out. In this project, yeast was used (*Saccharomyces cerevisiae*) pressed in 30g / L of mash. The fermentation was performed in 1L Erlenmeyer, which were placed in shaker for agitation and temperature control, around 35° C. The value equal to or less than 1° Brix was determined as a condition to the conclusion of the fermentation process and the total time of fermentation was written down. In the beginning and in the end of the fermentation process the cell viability and the contamination were analyzed. In obtained wine, analyses of acidity, ARRT, alcohol were performed and the amount of alcohol produced by fermentation and efficiency was determined. The results were submitted to analysis of variance, and the averages were compared by Tukey test ($P \leq 0.05$). The application of biocides in doses that were used in this study was not sufficient to control the contamination. The days of fermentation showed different results in relation to ARRT, the wine pH, temperature of fermentation, initial and final contamination and in the final viability. The essential oregano oil showed anti-foaming action during the fermentation, which is characteristic of high interest to the higher quality of conducting fermentations.*

Keywords: *contamination control, antibiotics, hop, oregano oil.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Processo fermentativo de modo batelada	18
FIGURA 2 - Processo fermentativo de modo contínuo	20
FIGURA 3 - Brix do caldo e mosto utilizados nos dias de fermentação	30
FIGURA 4 - ART (%) do mosto utilizado nos dias de fermentação.....	30
FIGURA 5 - pH do caldo utilizado nos dias de fermentação	31
FIGURA 6 - pH do mosto utilizado nos dias de fermentação.....	31
FIGURA 7 - Acidez do mosto utilizado nos dias de fermentação	32
FIGURA 8 - Efeito nos dias de fermentação sobre a quantidade de ARRT do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)	36
FIGURA 9 - Efeito nos dias de fermentação sobre o pH do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)	36
FIGURA 10 - Efeito nos dias de fermentação sobre o tempo de fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....	37
FIGURA 11- Efeito dos tratamentos biocidas (testemunha, kamoran, óleo de orégano e lúpulo) sobre a contaminação inicial. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).....	39
FIGURA 12 - Efeito nos dias de fermentação sobre a viabilidade final da fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)	39
FIGURA 13 - Temperatura máxima observada no shaker utilizado para ambientar as dornas de fermentação (Erlenmeyers de 500mL) durante o ensaio	40
FIGURA 14 - Efeito nos dias de fermentação sobre a contaminação inicial da fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)	41
FIGURA 15 - Efeito nos dias de fermentação sobre a contaminação final da fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)	41
FIGURA 16 – Formação de espuma no tratamento biocidas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ARRT	Açúcares Residuais Redutores Totais
ART	Açúcares Redutores Totais
Brix	Quantidade de sólidos solúveis contidos na solução de sacarose
H	Hora
L	Litro
mL	Mililitros
Nm	Nanômetros
OEO	Óleo essencial de orégano
pH	Potencial hidrogeniônico
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Produção de bioetanol.....	15
3.1.1 Cana-de-açúcar	15
3.1.2 Obtenção do caldo extraído da cana	16
3.2 Fermentação etanólica	17
3.3 Contaminação	20
3.4 Controle da contaminação	21
3.4.1 No preparo do mosto.....	22
3.4.2 Durante a fermentação	23
3.4.3 No tratamento do fermento	23
3.4.4 Controle com antibiótico	24
3.4.5 Biocidas naturais.....	24
3.4.5.1 Biocidas utilizados no presente estudo	25
3.4.5.1.1 Lúpulo	25
3.4.5.1.2 Óleo de orégano	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Preparo do mosto e análises realizadas	26
4.2 Processo fermentativo e análises realizadas	26
4.3 Análise de viabilidade e contaminação.....	27
4.4 Análises do vinho.....	28
4.5 Análise estatística	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Qualidade do mosto utilizado para fermentação.....	29
5.2 Análise do vinho e qualidade das fermentações utilizando tratamentos biocidas	32
5.3 Análises microbiológicas das fermentações utilizando tratamentos biocidas	37
5.4 Característica antiespumante do óleo de orégano.....	41
6 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A matéria-prima da produção do etanol no Brasil é a cana-de-açúcar. Estima-se que a produção de cana-de-açúcar na safra de 2012/2013 deverá aumentar cerca de 5,34%, passando de 36,88 milhões de toneladas para atuais 38,85 milhões. A produção total de etanol crescerá de 22,86 bilhões de litros para 23,96 bilhões, um incremento de 4,81% (COPERCANA,2012).

A produção de etanol se dá a partir do caldo obtido pelo segundo terno da moenda onde este sofre opcionalmente uma clarificação com leite de cal, aumentando o seu pH para torno de 6,0 a 6,5. O caldo clarificado é utilizado para o preparo do mosto, líquido açucarado de concentração conhecida prontamente fermentável dentro de padrões técnicos e econômicos, onde se adicionam os agentes fermentescíveis: as leveduras.

Estes microorganismos realizam o processo fermentativo, dando origem a uma substância conhecida como vinho levedurado. Este passará por um processo de centrifugação, separando o vinho das leveduras. O vinho delevurado ou “sem leveduras”, como é associado, segue para o processo de produção de etanol. As leveduras separadas na centrífuga passam por um processo de tratamento para serem reaproveitadas na fermentação.

O processo de tratamento pode ser feito via antibióticos que são compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, que inibem ou causam a morte de microorganismos específicos, apresentando seletividade quanto aos alvos. Como os alvos são específicos, o uso de antibióticos para o controle de contaminação em indústrias não é recomendado, pois induz à seleção de microorganismos resistentes (EGUCHI, 2007). Por questões de saúde pública, em muitos países, não é admissível usar uma levedura para ração animal ou até mesmo alimentação humana que apresente resíduos de antibióticos (TAUBE, 2009), tornando o uso de antimicrobianos de origem natural, biocida, uma alternativa segura, eficaz e econômica (BREGAGNOLI, 2006).

Os biocidas são formulações ou produtos específicos utilizados na desinfecção do mosto, tanques e equipamentos utilizados na fermentação. Vários desses produtos atendem as exigências de agências alimentícias de alguns países, embora alguns não sejam

regulamentados para uso em alimentos por não atingirem padrões sanitários mínimos (VENTURA, [s.d.]). O uso de biocida, além de não deixar resíduo, também não provoca a resistência bacteriana, apresentando também custo menor em relação aos antibióticos.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de alguns biocidas naturais, Lúpulo e Óleo essencial de orégano, no controle de bactérias contaminantes da fermentação etanólica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de bioetanol

3.1.1 Cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar teve como origem o Norte da Índia e percorreu por diversos lugares, chegando enfim na América. Foi introduzida por Martim Afonso de Souza em São Vicente no ano de 1522 (MARQUES *et al.*, 2001). Na classificação botânica essa planta pertence à família das gramíneas tendo como nome científico - *Saccharum spp* (GERMEK, 1989). Tal terminologia diz referência ao melhoramento genético ocorrido através da hibridação entre espécies *Saccharum* (DINARDO– MIRANDA *et al.*, 2008).

Com base em dados fornecidos pela Copercana (2012), essa planta é a matéria-prima utilizada para a fabricação de etanol e açúcar, havendo como estimativa de produção para a safra de 2012/2013 um aumento de 5,34%, passando de 36,88 milhões de toneladas (t) para as atuais 38,85 milhões (t) de produção de cana-de-açúcar. A produção total de etanol crescerá de 22,86 bilhões de litros para 23,96 bilhões, um incremento de 4,81%. Em setembro de 2012, o volume de etanol exportado pelo Brasil cresceu cerca de 159,72% em relação ao volume exportado em setembro de 2011. Comparado ao montante de exportação em agosto de 2012, este volume obteve acréscimo de 43,12%. Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), as exportações de etanol em setembro atingiram 452,7 milhões de litros comparado a 316,3 milhões de litros em agosto e 174,3 milhões de litros em setembro de 2011. A receita obtida com as vendas ficou em US\$ 331,2 milhões em setembro de 2012, alta de 125,76% em relação a setembro de 2011 e alta de 47,8% comparada a agosto de 2012.

3.1.2 Obtenção do caldo extraído da cana

Após a colheita, manual ou mecanizada, a cana-de-açúcar é levada para a indústria através do transporte principalmente rodoviário utilizando de caminhões. Essa matéria-prima não pode ficar em espera por longo período devido à perda de sacarose. Os caminhões passam por um sistema de amostragem no qual são identificados, pesados e retirados deles, com sonda oblíqua (mais utilizada devido a sua eficiência em coletar amostras dentre os diversos pontos da carga) ou com sonda horizontal amostras de cana. Essas amostras são encaminhadas ao Laboratório de Pagamento de Cana por Teor de Sacarose (PCTS), onde são realizadas análises químicas para verificar a qualidade da matéria-prima e para efetuar o pagamento ao produtor (RIPOLI; RIPOLI, 2008).

Após este processo a cana é encaminhada para a esteira de alimentação e para a mesa alimentadora sucessivamente, sendo preparada para a extração do caldo. Neste preparo estão inseridos processos de: lavagem de canas inteiras corte e desfibramento através de utilização de facas e desintegradores (MARAFANTE, 1993). Assim, os colmos ricos em sacarose são levados ao processo de extração.

Segundo Pappa (2011), o processo de extração do caldo da cana-de-açúcar pode ser realizado de duas formas: por moendas ou por difusores. No processo de extração por moendas, a cana-de-açúcar é prensada pelos rolos contidos no primeiro terno da moenda, sendo que o caldo extraído é direcionado à produção de açúcar por conter elevado teor de sacarose. A partir do segundo terno, a cana prensada sofre o processo conhecido como “embebição” sendo acrescida água para facilitar e melhorar a quantidade de sacarose (açúcar) removida. Tal processo de embebição ocorre do último terno para o segundo.

O processo de extração com o uso de difusores consiste em melhor desempenho, pois a porcentagem de sacarose retirada apresenta valor elevado em relação ao processo de moagem. Este, diferente do processo de moagem, é realizado por lixiviação: extração do caldo da cana com adição de água quente onde esta entra nas fibras do colmo realizando o processo conhecido como “open cell”. Tal processo não é utilizado em larga escala no Brasil, devido ao custo de implantação e devido ao bagaço sair com alto teor de umidade, fator que dificulta o processo de cogeração de energia. Para redução da umidade do bagaço são colocados dois ternos, de modo que o bagaço sai com esse parâmetro semelhante ao obtido somente com moendas. Ambos os processos têm como produto o caldo extraído (PAPPA, 2011).

3.2 Fermentação etanólica

No processo de fermentação etanólica se utiliza mosto, solução açucarada com concentração conhecida, sendo este compatível com a natureza e composição da matéria-prima (MARAFANTE, 1993) misturado com o fermento que irá utilizar os carboidratos disponíveis, nutriente para a produção do biocombustível. Um mosto rico em açúcares torna o processo dificultoso e está sujeito a fermentação lenta e incompleta, pois a levedura, devido a grande quantidade de etanol formado é inibida, deixando sem degradar e sem fermentar parte do açúcar presente (SILVA, 2011).

O caldo de cana, através do processo de fermentação etanólica, o qual envolve a reação de oxidação dos monômeros de açúcar, resulta, principalmente em etanol e gás carbônico (NELSON e COX, 2002). O açúcar encontrado no caldo da cana é conhecido como sacarose, sendo formado por uma molécula de glicose e frutose (MARAFANTE, 1993). Para que ocorra a transformação de açúcar em etanol para a obtenção de energia química e térmica, a molécula de sacarose precisa ser invertida para glicose e frutose e em seguida, os monômeros entrarem na via glicolítica. A via catabólica na qual há a degradação da sacarose é denominada inversão (CAETANO, 2010), tendo como precursora a enzima *invertase* produzida pela própria levedura (MARAFANTE, 1993).

A fermentação ocorre de forma anaeróbia, com ausência ou não de oxigênio. Esse processo bioquímico tem como função transformar todo carboidrato (açúcar) em etanol utilizando células, cepas de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (PELCZAR JUNIOR *et al.*, 1997), sendo resultado de uma série de passos como relata a equação estequiométrica:



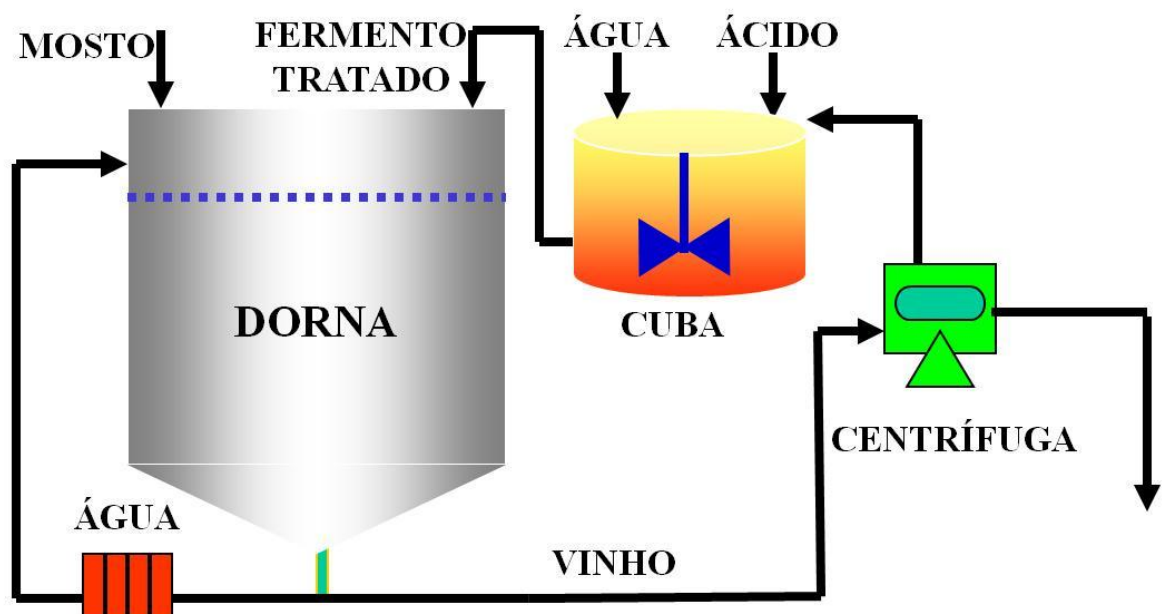
Glicose (glicólise e via fermentativa) **Etanol** **Dióxido de Carbono**
(GERMEK, 1989).

Uns dos parâmetros mais importantes diretamente ligados à eficiência do processo fermentativo é a temperatura, sendo que as leveduras são mais efetivas quando trabalham na faixa de temperatura entre 26 e 32°C (BADIN *et al.*, 2000). A qualidade da matéria-prima, a composição do caldo extraído, pH, acidez total, presença de microrganismos contaminantes, concentração de açúcares presentes no meio, etanol e disponibilidade de nutrientes, também estão relacionados à eficiência da fermentação (MUTTON e MUTTON, 2002).

Como relatado por Boden (2009), são conhecidas três fases presentes no processo fermentativo, sendo a primeira a fase de respiração onde é conhecida como "Lag time" é o período em que o fermento encontra-se em fase de reprodução até atingir a massa crítica, que conduz para a segunda fase, a fermentação. Para evitar a degradação e a invasão de microorganismos e minimizar o tempo de fermentação, transformação do açúcar em etanol é necessário realizar a sanitização e a inoculação (hidratação/ativação) de forma correta. Baseado em dados do mesmo autor, a segunda fase ou fase de fermentação consiste na ativação do fermento, que realizará o processo de degradação dos açúcares presente no mosto, transformando-os em CO₂ e etanol. A terceira fase, é conhecida como sedimentação, onde baseia-se na perda da quantidade de açúcar presente no mosto. O fermento, devido à baixa concentração de substrato (açúcares), começa a se sedimentar para a parte inferior da dorna de fermentação, através da floculação. Nesta etapa, vale ressaltar que o fermento sedimentado, floculado se encontra dormente e não morto. Para reabilitá-los novamente é preciso adicionar nova quantidade de açúcares.

Marques *et al.* (2008) referem-se aos vários processos de fermentação alcoólica, sendo estes processos individuais, por cortes, batelada, por decantação, com separação do fermento por centrifugação do vinho e de forma contínua. O processo individual é mais utilizado para a produção de bebidas finas, pois consiste na preparação de um novo inóculo para cada fermentação ocorrida. A figura 1 apresenta o processo de fermentação batelada.

FIGURA 1 - Processo fermentativo de modo batelada



O processo de fermentação por cortes consiste na transferência da metade do volume em processo fermentativo para outra dorna, visando um valor inicial de Brix pela metade. Para que ocorra essa transferência citada, é necessário que o valor do Brix seja metade do valor inicial. A segunda dorna que antes se encontrava vazia e agora se encontra com metade deste vinho levedurado, inicia o processo de alimentação com mosto até o seu enchimento total. A dorna original, ou primeira dorna, do processo fermentativo é conduzida até o final, completando o seu enchimento e esperando o final da fermentação, desta dorna será obtido o vinho. Se houver problemas com contaminação não será necessário o descarte de todo o vinho levedurado, apenas o da dorna contaminada. (MARQUES e MARQUES, 2008).

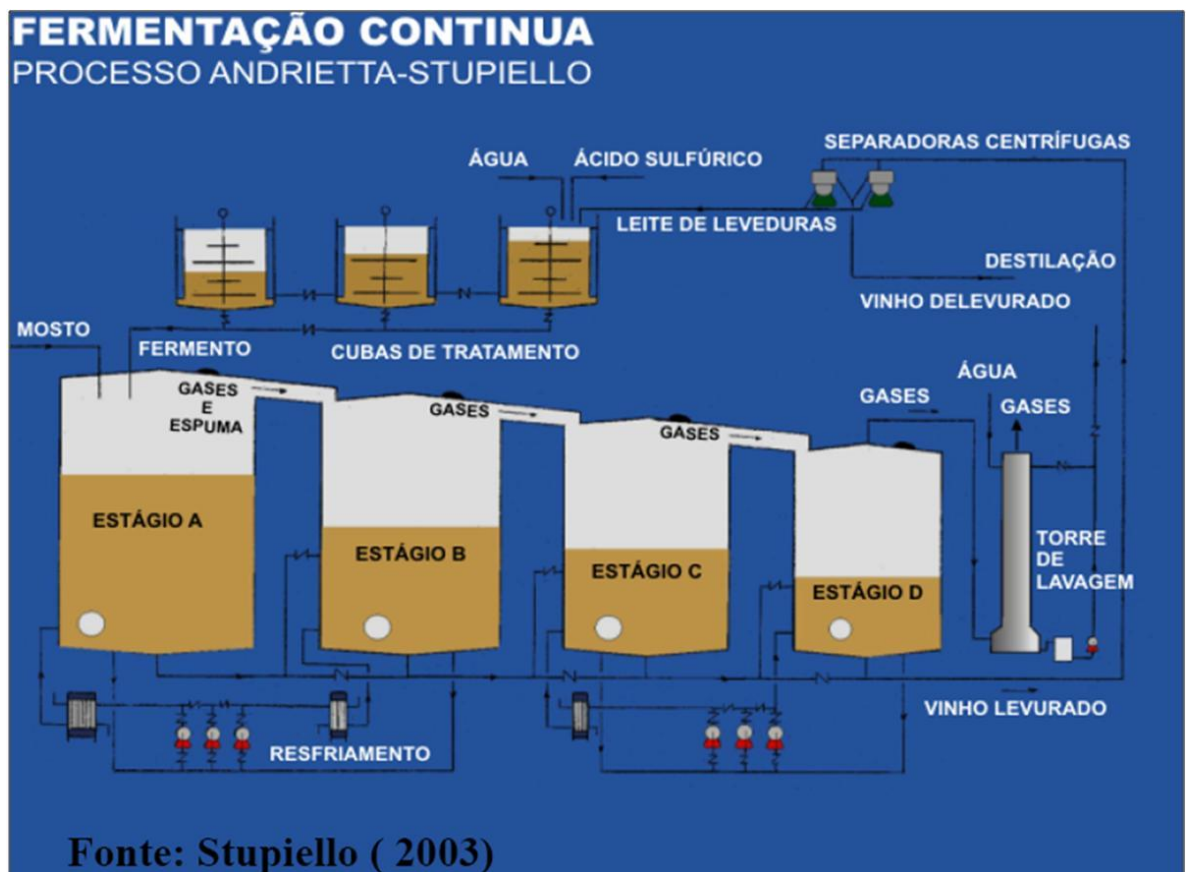
Outro processo é conhecido como fermentação por decantação, sendo esta a primeira a ser testada em relação à utilização de microorganismos em fermentação sucessiva. Tem como base a separação do microorganismo, levedura, do meio fermentativo, vinho. Tal separação ocorre devido à força gravitacional, sendo que em uma média de três horas se obtém a separação esperada; a separação superior com baixa concentração de leveduras e a inferior com elevada concentração de leveduras. Como término deste processo, retira-se a camada superior através de tubulações (MARQUES *et al.*, 2008).

Yokoya (1995), ressalta que no processo de fermentação com separação do fermento por centrifugação do vinho tem-se automatização com o uso de turbinas visando à aceleração do processo de separação gravitacional, sendo utilizado nas indústrias sucroenergéticas para a separação rápida do fermento do vinho. As leveduras separadas são enviadas a recipientes denominados cubas e sofrerão tratamento. Após o tratamento o fermento retornará para o processo produtivo. Este fator visa maior economia de custos referente à compra de leveduras, sendo que estas são utilizadas durante o período da safra. Este processo também é utilizado no aumento dos ciclos fermentativos, possibilitando maior concentração de inóculo utilizado nas próximas fermentações. No mesmo trabalho, o autor destaca que a eficiência e a produtividade fermentativa são elevadas, pois o consumo de açúcar para a produção de células é drasticamente reduzido e a possibilidade de outros microorganismos, não desejáveis, crescerem é baixa devido à alteração de estrutura geométrica “espaço x tempo”.

No processo contínuo, figura 2, a fermentação se dá em uma dorna e em sequência o mosto prontamente fermentável é encaminhado para outras dornas, em torno de 4 a 5 para que na última dorna se encerre o processo, com consumo de todo o açúcar disponível do mosto. Esse sistema é visto como o mais avançado no mercado por apresentar a automação do processo, minimizando erros. Como todos os processos, este também apresenta pontos

positivos e negativos. Em relação ao último a contaminação é o principal risco, sendo necessário realizar o controle químico e microbiológico do processo, porém se mesmo assim ocorrer contaminação, é difícil a recuperação (MARQUES *et al.*, 2008).

FIGURA 2 - Processo fermentativo de modo contínuo



3.3 Contaminação

Desde o processo agrícola, plantio, até o processo industrial para a obtenção do bioetanol, a matéria-prima e seu produto estão suscetíveis à contaminação devido à vasta presença de microorganismos (PAPPA, 2011). O caldo de cana, o melaço e por consequência o mosto, permitem o crescimento de uma série de microorganismos por apresentar características físico-químicas favoráveis (NOLASCO JR, 2005).

Uns dos vários problemas causados pela presença de microorganismos contaminantes (bactérias) no processo de fermentação etanólica é a floculação. Esta causa redução na velocidade de fermentação, dificuldade de operação das centrífugas, entupimentos em bicos, tubulações, aumento de massa no fundo das dornas (SERRA *et al.*, 1979).

No processo industrial referente à extração do caldo há alguns tipos de bactérias e leveduras selvagens (que acompanham o caldo, de mesma espécie que será inoculada). Predominantemente existem com mais frequência bactérias gram-positivas, dos gêneros *Lactobacillus* e *Bacillus*. As bactérias gram-negativas estão presentes nas plantas e contaminam o maquinário de colheita, transporte e extração (YOKOYA *apud* GALLO, 1989).

Além destes, estão presentes também *Acetobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* que são os contaminantes diretamente ligados ao fracasso da fermentação por formarem ácido lático, ácidos orgânicos e promoverem a floculação (AMORIM e OLIVEIRA, 1982).

Outros contaminantes são as leveduras selvagens. Estas por serem mais resistentes e apresentarem rápida reprodução, podem dominar em pouco tempo o meio em que ocorre o processo fermentativo, não dando espaço para leveduras selecionadas que serão adicionadas ao processo (CABRINI e GALLO, 1999). As leveduras selvagens quebram a molécula de sacarose e transformam a maior parte do açúcar em ácido acético, sendo a menor parte utilizada para produção de bioetanol. Os principais gêneros encontrados na cana-de-açúcar saudável são *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (ANTONINI, 2012) sendo que gêneros do tipo *Dekkera* e *Brettanomyces* têm sido relacionados também a problemas nos processos fermentativos para produção de etanol (PARALUPPI, 2012).

3.4 Controle da contaminação

O controle dos microorganismos contaminantes no processo é fundamental não somente para se obter bom rendimento fermentativo, mas, também, como garantia de um produto final de qualidade (NAVES *et al.*, 2010). Só se consegue controle de contaminantes eficiente através do uso de antimicrobianos adequados, com dosagens corretas, pois a aplicação racional destes produtos deve visar às populações de bactérias e não de leveduras (CECCATO-ANTONINI, 2004). O trajeto percorrido pelo caldo bruto da cana desde o

processo de extração nas moendas até a alimentação na dorna de fermentação caracteriza-se por um dos pontos de proliferação de microorganismos contaminantes (ALQUATI, 1990). Os outros dependem da qualidade da matéria-prima e da água de diluição do mosto.

3.4.1 No preparo do mosto

Estudos relatam que a utilização de radiação ultravioleta (UV), fornecida pelo sol, em quantia de 100 a 400 nanômetros (nm) apresenta boa condição de controle para a preservação de alimentos e a sanitização de embalagens e da própria água (LOPEZ *et al*, 2005). Para se obter este controle, é necessário utilizar métodos artificiais, onde a radiação UV é emitida por bulbos de lâmpadas incandescentes e bulbos de halogêneo (PARROTTA e BEKDASH, 1996). As fontes artificiais como lâmpadas de arco de mercúrio de baixa e média pressão, são as mais comuns. Dentre a faixa de radiação de 100 a 400 nm, encontra-se a radiação UV-C, de 200 a 280 nm, que além de atuar como fungicida e bactericida, atua como estressor abiótico (MERCIER *et al.*, 1993). Se tratando de controle de microorganismos, a absorção da radiação ionizante causa alterações químicas nos compostos moleculares das células, alterando sua atividade, atividade celular (ALCARDE, 2000). A alteração comumente notória é referente ao DNA, afetando as funções de reprodução, considerada a de maior importância (URBAIN, 1986 *apud* ALCARDE, 2000). Este tratamento aplicado ao controle de contaminação no preparo do mosto, tem como benefícios a não utilização de produtos químicos, a não alteração de cor, sabor, odor, pH, além de não deixar resíduos (JUNQUEIRA, 2009).

Em concordância com Alcarde (2000), o controle de contaminantes por radiação gama apresentou uma redução microbiológica mais eficiente em relação ao antibiótico utilizado nas indústrias, Kamoran HJ[®], favorecendo aspectos bioquímicos e aumentando o rendimento fermentativo. O tratamento com luz ultravioleta pode ser utilizado no próprio mosto preparado, com baixa eficiência ou na água de diluição utilizada para reduzir o Brix elevado, por exemplo, do melaço (OLIVEIRA, 2011).

3.4.2 Durante a fermentação

O controle de um processo fermentativo tem como início os cuidados no manuseio da cultura, nas fases iniciais de propagação em laboratório, se estendendo até a manutenção de condições ambientais favoráveis no fermentador (BORZANI *et al.*, 1975).

O tratamento utilizado nesta etapa é chamado de tratamento térmico de controle de contaminantes durante o processo fermentativo. Para se obter valores significativos, é preciso adotar uma faixa de temperatura que se encontra entre 31 e 34°C. O controle de contaminação no vinho não pode ser em altas temperaturas porque além de eliminar os contaminantes, elimina também as leveduras (MARQUES e MARQUES, 2008).

A faixa de temperatura ideal para a maioria das bactérias contaminantes do caldo onde apresentam desenvolvimento considerável, situa-se na região mesófila, variação de temperaturas entre 25°C a 40°C (PELCZAR, 1996).

A tentativa de reduzir a contaminação durante a fermentação não tem sido recomendada pelos custos elevados. Nesse momento deve-se dar as melhores condições para a realização do processo fermentativo realizado pela levedura selecionada, em detrimento dos outros microrganismos. Durante a fermentação é difícil controlar a contaminação e por isso, a aplicação de biocidas pode ser uma alternativa a ser testada.

3.4.3 No tratamento do fermento

Nesta etapa, as leveduras que foram separadas pelo processo de centrifugação, logo após o fim da fermentação, são submetidas ao tratamento com emprego geralmente, de diluição com água, para diminuir a toxidez dos compostos como o próprio etanol, em seguida é aplicado ácido sulfúrico, abaixando o pH para 2,5 para redução da contaminação. (SOUZA, 2007). O uso deste componente químico tem como causas fatores como a corrosividade, oxidação e problemas voltados à área da saúde.

Além de reduzir a carga microbiana contaminante, este tipo de tratamento se mostrou eficiente na redução de formação de flóculos (LUDWIG *et al.*, 2001). Dentre tantas vantagens há um fator que se mostrou contraditório a todos os benefícios apresentados. A floculação não se mostrou eliminada, pois quando se retorna o inóculo tratado para a dorna de fermentação, há a

floculação. Tal agravante ocorre por estar em função e devido a variação de pH (CEBALLOS-SCHIAVONE, 2009). Nessa fase pode ser realizado o controle com uso de antibióticos. Esse controle é realizado quando somente o tratamento simples não é suficiente para reduzir a carga microbiana.

3.4.4 Controle com antibiótico

Este controle visa à eliminação de microorganismos indesejáveis, no qual dificultará e/ou interromperá o processo fermentativo. O uso de antibióticos no Brasil se dá, de forma comumente pela adição de penicilina e seus derivados, por apresentarem fatores econômicos menores e a não exigência de alterações técnicas, em relação aos demais antibióticos nas dornas de fermentação (FERRARI *et al.*, 2008). A escolha de tal bactericida está associada ao custo do tratamento (LIMA *et al.*, 2001).

O fator mais importante quanto ao uso destes microbicidas (antibióticos) específicos, está na aplicação prolongada e contínua, pois têm levado à seleção de microorganismos patogênicos e mutantes mais resistentes a tais compostos que seriam seus inibidores (VENTURA, 2012). Uma alternativa que vem se tornando eficaz e se mostra econômica, é o uso de antimicrobianos naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2000 *apud* VARGAS *et al.*, 2004). O uso de antibióticos limita a utilização do excesso de fermento que é retirado, submetido ao processo de secagem controlada, como ração animal. Os lotes de leveduras secas que possuem o resíduo do antibiótico devem ser incinerados.

3.4.5 Biocidas naturais

Os biocidas naturais são formulações ou produtos específicos utilizados na retirada de corpos capazes de causar infecção do mosto, tanques e equipamentos utilizados na etapa da fermentação. Variados produtos deste gênero atendem as exigências de agências alimentícias, sendo que alguns não estão regulamentados para uso em alimentos, devido a não atingirem padrões sanitários mínimos (VENTURA, 2012).

3.4.5.1 Biocidas utilizados no presente estudo

3.4.5.1.1 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) - Pertence à família das Canabidáceas, possuindo componentes com ação bactericida. Contribuem no processo de fabricação da cerveja, sendo responsável por dar aroma e o amargor da bebida (NOGUEIRA, 2004).

É constituído de óleos essenciais de 0,2 a 3% (α e β ácidos). Os β – ácidos ou lupulonas (1,5 a 9,5%) possuem ação bactericida, agindo diretamente no transporte de metabólitos presentes na membrana celular. Esses ácidos alteram também o pH intracelular. Inibem fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas por estarem relacionados ao grupo prenil, presente em suas cadeias laterais. Os α – ácidos ou humulonas (2,0 a 16,0 %), estão relacionados ao controle de infecções e também são aplicados na produção de cerveja (ANSELMINI, 2008; SILVA e FARIA, 2008).

3.4.5.1.2 Óleo de orégano

O óleo essencial de orégano (OEO) (*Origanum vulgare*) pertence à família das Lamiáceas, sendo o óleo utilizado no controle antimicrobiano ligado a conservação de alimentos. Os principais componentes relacionados a atividade antimicrobiana do OEO são o carvacrol e o timol, os quais possuem estruturas muito similares diferindo apenas na posição da hidroxila no anel fenólico (BÍSCOLA, 2007; SILVA *et al*, 2010). Estes componentes atuam aumentando a permeabilidade da membrana celular bacteriana, principalmente por possuírem a capacidade de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas (BURT, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nos laboratórios da FATEC/Jaboticabal em outubro de 2012. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso aplicando-se os tratamentos biocida: Testemunha (sem aplicação de controle), Kamoran[®] (controle positivo), óleo de Lúpulo, óleo essencial de orégano, em 5 repetições. O delineamento foi realizado em blocos para verificar a influência dos dias diferentes de fermentação.

Para o Kamoran[®] foi utilizado a dosagem de 3 mg/L, recomendado para tratamento do fermento, segundo Química Real (2012). Para o óleo de Lúpulo foi utilizada 10 mg/L, segundo Química Real (2012). O óleo essencial de orégano (OEO) foi 0,5%, conforme SILVA (2010).

4.1 Preparo do mosto e análises realizadas

Para a realização do experimento foi necessário realizar o preparo do mosto que foi utilizado no processo fermentativo. Tal preparo foi feito através da Cruz de Cobenze (regra das diluições), a qual teve como objetivo a correção do Brix (SCHENEIDER, 1979) do mosto para 14. Foi adicionada a água de diluição (água deionizada), seguindo-se da medição do Brix através do refratômetro ABBE Refractometer Quimis[®] para confirmação da correção realizada. Essa diluição foi feita em cada dia da condução do experimento, pois o caldo era diferente e proveniente de uma Usina na região de Jaboticabal-SP. Foi corrigido também o pH do mosto para 4,5, utilizando-se de ácido sulfúrico e para se medir o valor, utilizou-se pHmetro (PG 1800 – digital).

Após estas etapas, foi realizada a análise da determinação da Acidez (Ácido Sulfúrico), e verificação da quantidade de ART (açúcares redutores totais), segundo Lane & Eynon (1934).

4.2 Processo fermentativo e análises realizadas

Para o processo de fermentação foi utilizada levedura prensada (*Saccharomyces cerevisiae*) na quantidade de 30g/L de mosto. Antes do início da fermentação a levedura

prensada foi colocada em quatro béqueres diferentes contendo 50ml de glicose a 1%, permanecendo nesta solução por 1h.

Após este tempo de espera, as leveduras foram transferidas para tubos de plástico para centrifugação (centrífuga Spencer 80-2B), a 3000rpm por 5min. Em seguida, foi retirado o sobrenadante e as leveduras foram transferidas para erlenmeyer (1L) (dorna de fermentação), com lavagem dos tubos com os primeiros 100ml do mosto (primeira alimentação), adicionados para cada tratamento. Logo após, foram realizadas alimentações cronometradas de 15 em 15 minutos com 100ml de mosto até atingir 500mL, para adaptação do fermento ao mosto preparado. Após a quarta alimentação, foram acrescidos, nos respectivos erlenmeyers, os tratamentos biocidas. Esperaram-se mais 15 minutos, e em seguida, foram retiradas amostras para as análises de viabilidade e contaminação. Após isso, os erlenmeyers foram colocados em Shaker (Incubadora Shaker de bancada CT-712, Cientec).

A fermentação foi monitorada (contagem de tempo - h) e para indicar o final, foi realizada análise de Brix com a utilização de densímetro. Sempre que os valores eram menores do que 1 se considerava o final da fermentação.

4.3 Análise de viabilidade e contaminação

A análise de viabilidade foi realizada conforme Lee et al., (1981) para o início da fermentação, logo após 15 minutos da última alimentação e para o final, após o Brix medido ser menor do que 1. Também foi realizada a análise da viabilidade do fermento. Para a contaminação, a determinação ocorreu através da contagem de colônias resultante do plaqueamento pelo sistema Petrifilm, no início e final da fermentação, juntamente com a análise de viabilidade. As placas Petrifilm™ são sistemas prontos de meio de cultura que contém diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores, adequados à recuperação de cada tipo de microorganismos pesquisados (3M do Brasil, 2012). O plaqueamento foi realizado em câmara de fluxo laminar (Pa 50 Pachane), sendo as placas colocadas em estufa (Biopar), favorecendo o crescimento de microorganismos presentes por 48h. Para a contagem das colônias de bactérias, foi utilizada como ferramenta a lupa (Nova optical Systems XTS -20, Zoom Stereo Microscope).

4.4 Análises do vinho

A acidez sulfúrica, os Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) e o teor alcoólico do vinho foram realizados conforme CTC, (2005). A quantidade de álcool produzido e a eficiência fermentativa foram realizadas conforme descrito em Fernandes (2006).

4.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey, segundo Banzatto e Kronka, 2006.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade do mosto utilizado para fermentação

O caldo foi coletado em uma Usina na região de Jaboticabal-SP e foi utilizado no preparo do mosto que, no dia, era igual para todos os tratamentos e por isso, foi realizada apenas a análise do caldo e do mosto utilizado para o processo fermentativo. Portanto, para cada dia do experimento, foi utilizado caldo de cana diferente interferindo diretamente na qualidade do mesmo. Para a realização do processo fermentativo foi necessário diminuir o Brix do caldo, que apresentava valores próximos a 18 (Figura 3) para 14 (Figura 3). Esse procedimento foi realizado para padronizar o início do processo fermentativo. Para o 5º dia de fermentação verificou-se que o caldo apresentou Brix menor. Esse fato ocorreu devido à precipitação no 4º dia ter influenciado negativamente a qualidade do caldo, com a redução do Brix. Verificou-se que a quantidade de açúcares redutores totais (ART) (Figura 4) foi ligeiramente maior no quarto dia (13,78%) do que os demais. Esse resultado (quarto dia) é esperado, pois o caldo de cana apresenta quantidade de carboidratos elevada dentro dos sólidos solúveis do mosto.

Os valores de pH do caldo (Figura 5) ficaram ao redor de 5, o que indica que o mesmo não estava deteriorado antes de ser utilizado para o preparo do mosto. Em uma segunda etapa do preparo, esse pH foi corrigido (Figura 6), com uso de ácido sulfúrico para 4,5 para favorecer o fermento em relação aos contaminantes. Os valores de acidez do mosto (Figura 7) oscilaram bastante, tendo pico no terceiro dia de experimento, com valor elevado, indicando ser o dia que o caldo apresentou maior contaminação. A acidez indica indiretamente a contaminação, sendo que valores mais elevados indicam contaminação maior. Por outro lado, valores elevados de acidez podem indicar que a cana não está no estágio de maturação adequado, pois quanto mais nova é a planta, maior pode ser esse parâmetro.

FIGURA 3 - Brix do caldo e mosto utilizados nos dias de fermentação

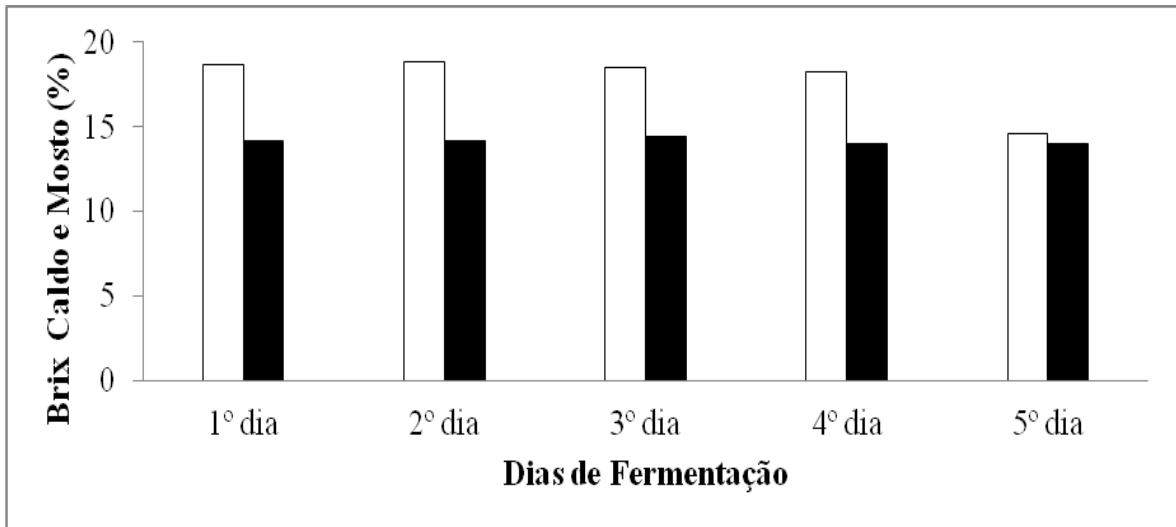


FIGURA 4 - ART (%) do mosto utilizado nos dias de fermentação

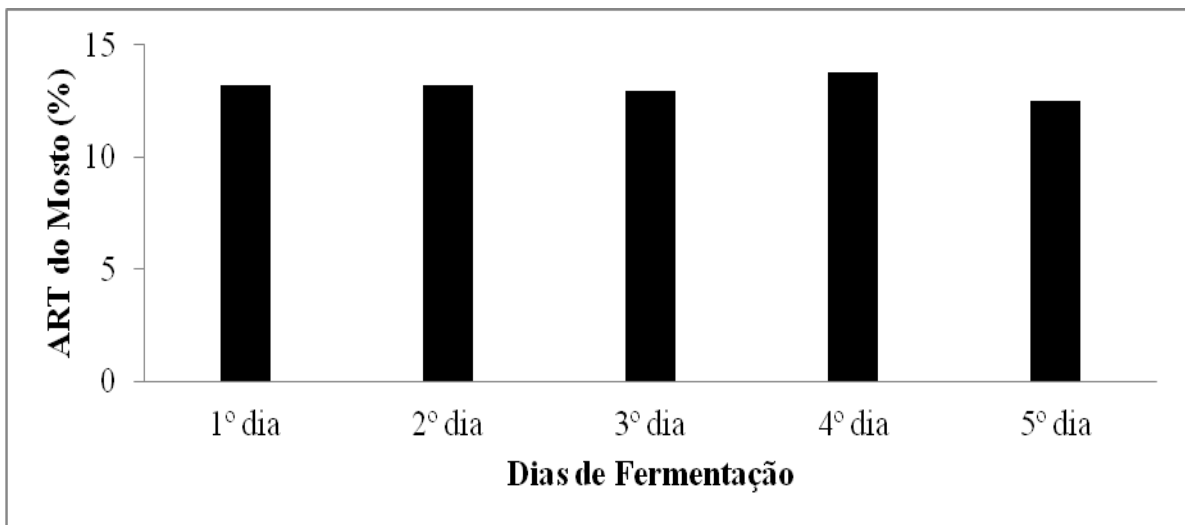


FIGURA 5 - pH do caldo utilizado nos dias de fermentação

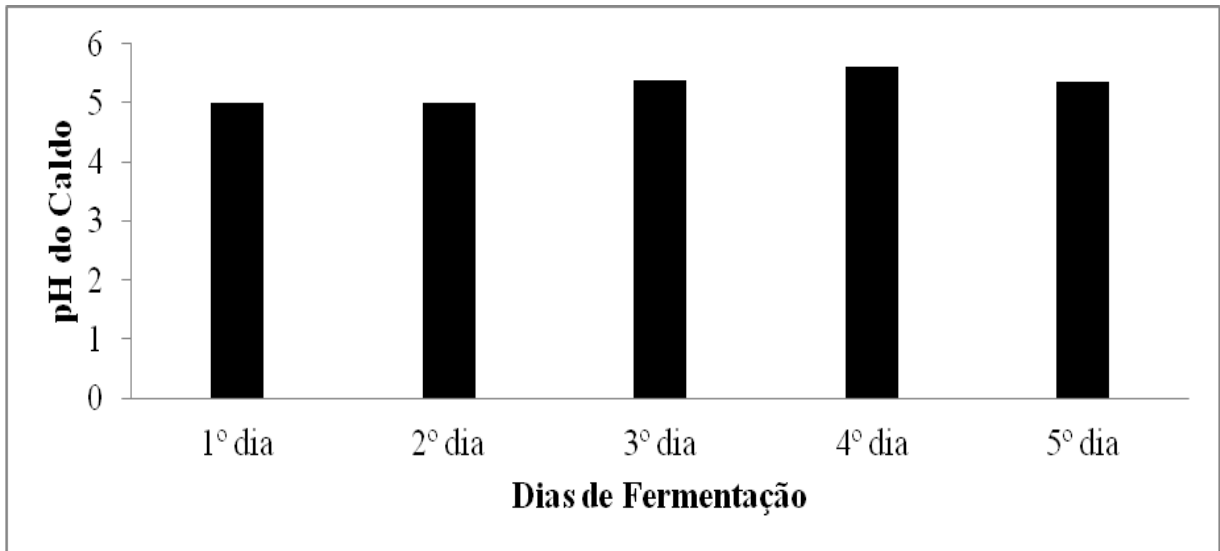


FIGURA 6 - pH do mosto utilizado nos dias de fermentação

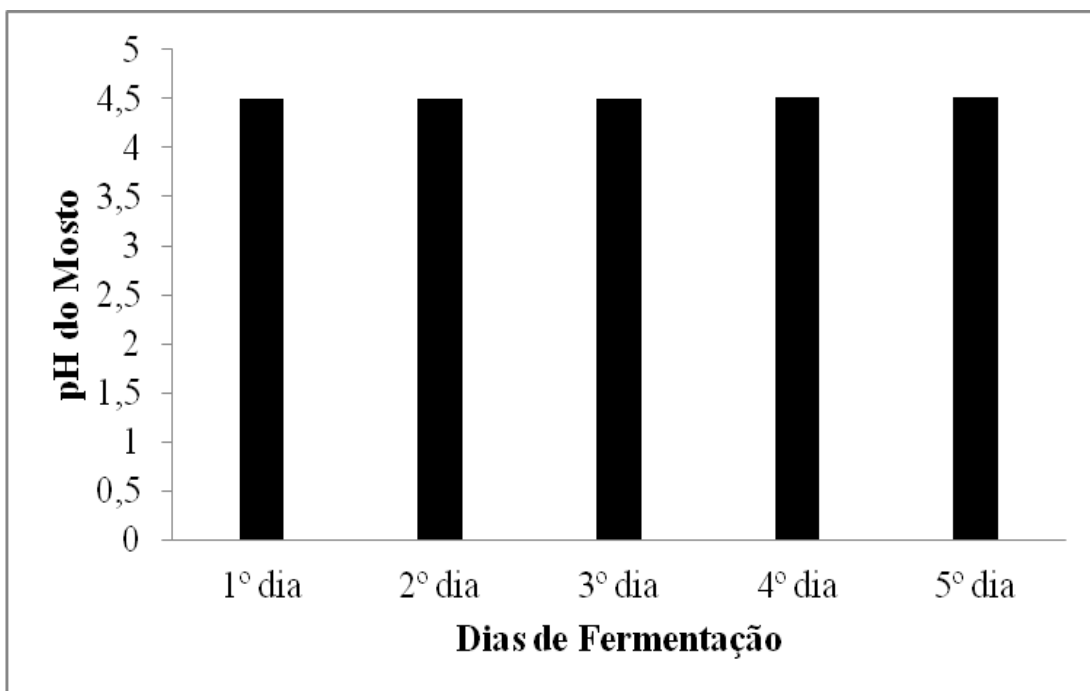
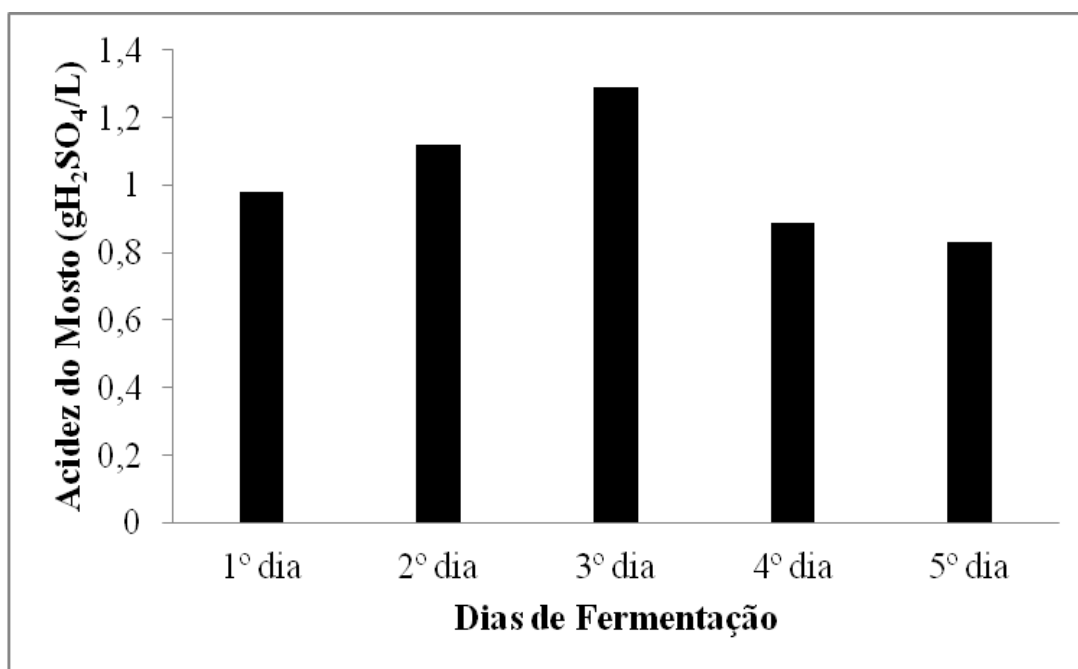


FIGURA 7 - Acidez do mosto utilizado nos dias de fermentação



5.2 Análise do vinho e qualidade das fermentações utilizando tratamentos biocidas

A quantidade de biocidas (lúpulo e OEO) e do antibiótico utilizado nesse estudo foi semelhante ao recomendado para o tratamento do fermento. Esse procedimento foi utilizado, pois se esperava que houvesse favorecimento do fermento em relação às bactérias, propiciando assim, aumento na produção de etanol, o que viabilizaria o custo de aplicação desses produtos.

O controle da contaminação não deve ser priorizado utilizando-se somente um método. Apesar de as fermentações terem sido realizadas em erlenmeyers, que simularam as dornas de fermentação (processo batelada), tem-se a necessidade de uso de controle dentro das dornas utilizadas, por exemplo, no processo contínuo fermentativo. Se houvesse controle, uma das alternativas a serem empregadas num processo contínuo para controle da contaminação seria o uso dos biocidas naturais.

Na tabela 1, verificou-se que os tratamentos aplicados não foram eficientes para melhorar o processo fermentativo. As dosagens utilizadas não foram suficientes para

aumentar a produção de etanol. Para os blocos houve diferença significativa para os valores de ARRT, pH do vinho, e no tempo de fermentação.

Para o ARRT (Figura 8) do vinho, verificou-se que no quarto dia de fermentação não houve aproveitamento total dos açúcares disponíveis no mosto, como aconteceu nos demais dias. O final da fermentação somente era realizado quando o Brix final era menor do que 1. Dessa forma, era anotado o tempo total e se deu prosseguimento a realização de análises microbiológicas.

Para o pH do vinho, figura 9, se verifica que no 4º dia de fermentação o valor foi maior. Indicando que nesse dia o processo fermentativo teve menor influência da contaminação. Quanto mais elevado for o pH, melhor a qualidade do vinho. No primeiro dia o pH do vinho foi o menor, indicando ser esse o dia de fermentação mais difícil por causar estresse na levedura. Tal estresse é causado devido a grande concentração de açúcares do meio, como também, devido ao meio se encontrar ácido.

TABELA 01 - Resultado da análise do teste F e do teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para Brix Final (%), ARRT (%), Acidez Final ($\text{gH}_2\text{SO}_4/\text{L}$), pH, Teor alcoólico (%), Álcool produzido (mL) no vinho e eficiência fermentativa e tempo da fermentação submetidas a tratamentos com biocidas (testemunha, kamoran, óleo de orégano e lúpulo) em cinco dias

Causas de variação	Brix Final	ARRT	Acidez Final	pH	Teor alcoólico	Alcool Produzido	Eficiência	Tempo de Fermentação
Tratamentos (F)	0,1593 ^{ns}	1,8889 ^{ns}	0,8036 ^{ns}	0,7913 ^{ns}	0,8320 ^{ns}	0,8320 ^{ns}	0,8310 ^{ns}	0,8837 ^{ns}
Testemunha	0,5000 A	0,1560 A	2,9740 A	3,5620 A	11,0440 A	30,9232 A	80,8404 A	7,6980 A
Kamoran	0,4800 A	0,1820 A	2,9300 A	3,5540 A	10,4160 A	29,1648 A	76,1262 A	7,7040 A
Orégano	0,5000 A	0,1540 A	2,9840 A	3,5160 A	10,0000 A	28,0000 A	73,0931 A	7,7040 A
Lúpulo	0,5600 A	0,1480 A	2,7500 A	3,5840 A	10,5440 A	29,5232 A	76,9778 A	7,5380 A
Blocos (F)	0,3186 ^{ns}	196,3333 ^{**}	1,7241 ^{ns}	51,5600 ^{**}	1,6979 ^{ns}	1,6979 ^{ns}	2,0741 ^{ns}	26,7342 ^{**}
1	0,5250 A	0,0700 B	3,0700 A	3,2125 D	10,3900 A	29,0920 A	75,5442 A	7,4200 C
2	0,4250 A	0,0650 B	2,8575 A	3,7475 AB	11,5300 A	32,2840 A	83,8330 A	7,2575 C
3	0,5750 A	0,0850 B	3,1150 A	3,6025 B	9,6250 A	26,9500 A	71,2799 A	7,2925 C
4	0,5250 A	0,4650 A	2,8125 A	3,8275 A	10,3250 A	28,9100 A	71,8029 A	8,4400 A
5	0,5000 A	0,1150 B	2,6925 A	3,3800 C	10,6350 A	29,7780 A	81,3369 A	7,8950 B
CV	38,05	15,31	9,34	2,00	10,04	10,04	10,20	2,55

^{ns} – não significativo ($P > 0,05$); * Significativo a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$); ** Significativo a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$);

FIGURA 8 - Efeito nos dias de fermentação sobre a quantidade de ARRT do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

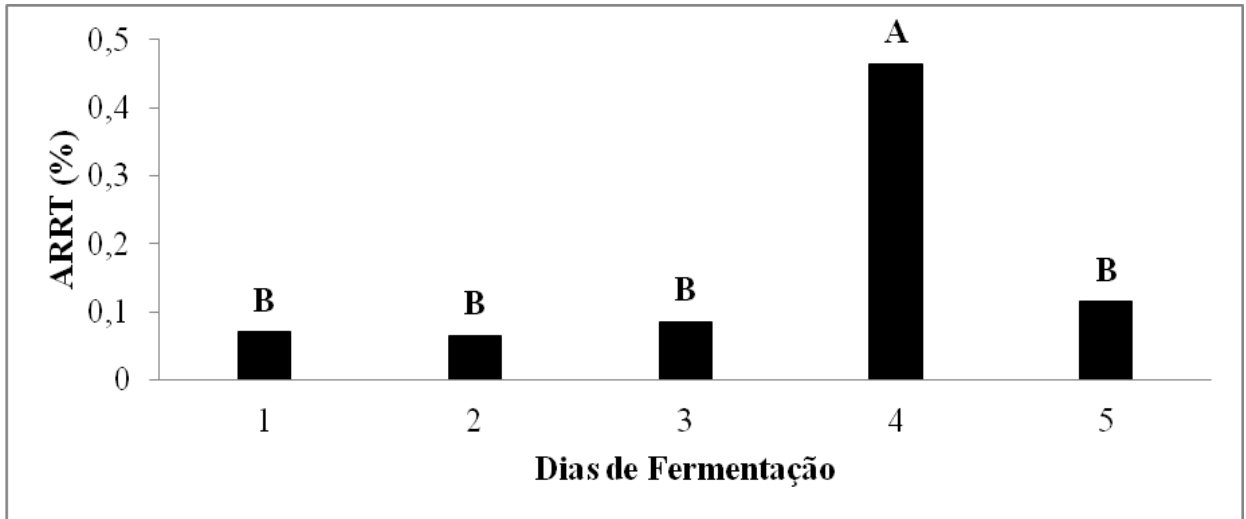
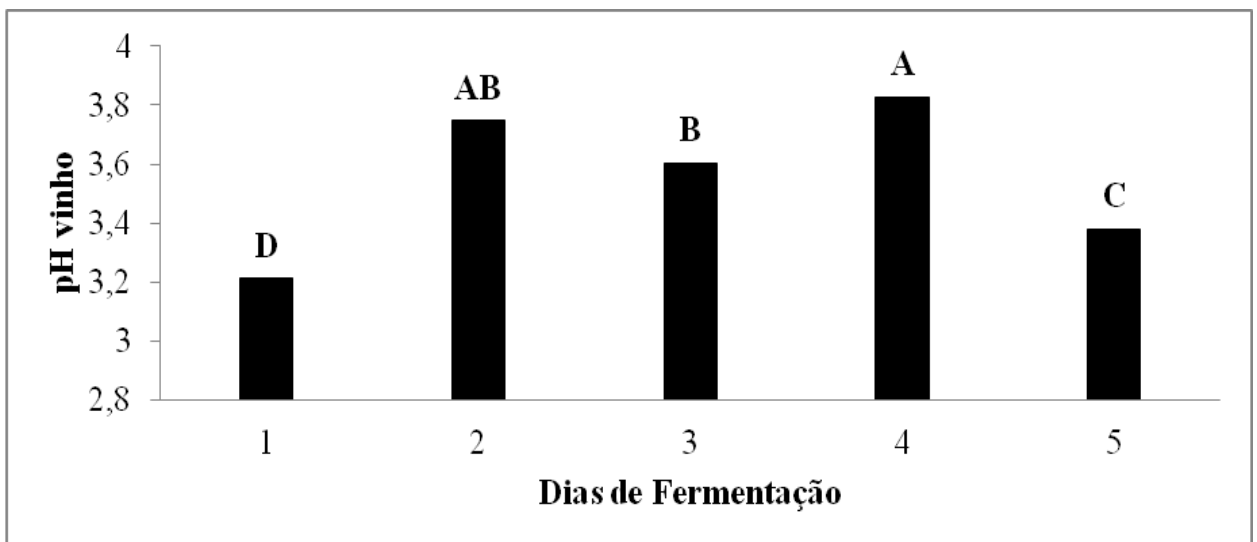
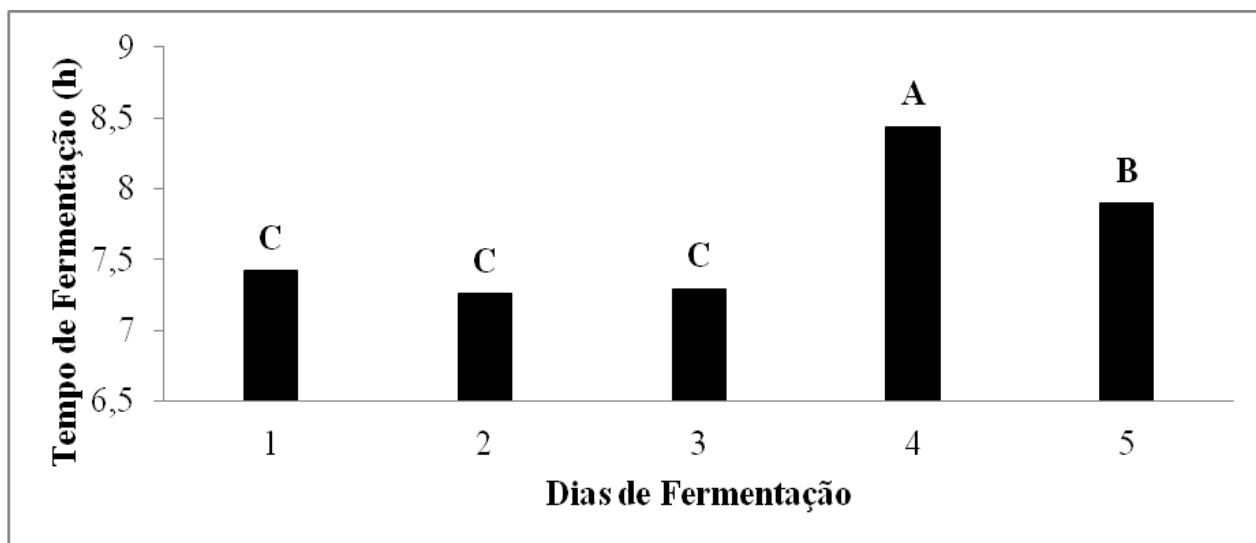


FIGURA 9 - Efeito nos dias de fermentação sobre o pH do vinho. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)



Para o tempo de fermentação (Figura 10) verificou-se que no quarto dia esse parâmetro foi maior. O tempo maior se deu porque o mosto utilizado tinha maior concentração de ART, o que levou ao aumento de tempo para conversão dos açúcares para o bioetanol. Entretanto, apesar de o final da fermentação ser decretado quando o valor do Brix fosse menor do que um, o que foi feito todos os dias, ainda haviam açúcares redutores na média de todos os tratamentos, que não foram convertidos.

FIGURA 10 - Efeito nos dias de fermentação sobre o tempo de fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)



5.3 Análises microbiológicas das fermentações utilizando tratamentos biocidas

Na tabela 2 verificou-se que os tratamentos biocidas não influenciaram o aumento da viabilidade inicial das células de levedura e tão pouco reduziram significativamente a contaminação inicial e a final do processo fermentativo. Isso se deve a elevada contaminação encontrada no caldo proveniente da usina que chega a valores maiores do que 10^4 UFC/mL. Para adequada fermentação, a quantidade de contaminantes do mosto deveria estar na ordem de 10^2 UFC/mL.

Entretanto, houve diferença significativa detectada pelo teste F nos tratamentos empregados, embora não significativa pelo teste de Tukey, mais rigoroso estatisticamente. Na Figura 11, verifica-se a tendência do tratamento com o antibiótico Kamoran® e o óleo de lúpulo reduzir a contaminação. O que não se confirmou na análise de contaminação final. A contaminação inicial foi sempre realizada após 15min. da aplicação do tratamento com a última alimentação. Novamente, as dosagens aplicadas não foram suficientes para controlar a contaminação durante o processo fermentativo.

Para os dias de fermentação houve diferença significativa para a viabilidade final, contaminação inicial e contaminação final (Tabela 2). Para o segundo dia, houve redução da viabilidade celular final (Figura 12), provavelmente pela elevada temperatura observada na

fermentação nesse dia (Figura 13) que passou dos 35°C. Essa temperatura (38°C), pode ser explicada pela elevada temperatura no dia de condução desse processo. Numa outra usina da região, foi relatado que nesse dia a temperatura da água do trocador de calor (responsável por controlar a temperatura da dorna) estava acima de 35°C, o que levou a problemas para a manutenção da qualidade da fermentação. Portanto, é possível encontrar processos fermentativos sendo conduzidos em temperaturas extremamente elevadas. Para ensaios futuros, recomenda-se eficiente controle da temperatura da fermentação. O equipamento (Shaker) utilizado para ambientar os erlenmeyes não estava conseguindo controlar a temperatura programada para 32°C.

TABELA 02 - Resultado da análise do teste F e do teste de Tukey ($P \leq 0,05$) para Viabilidade inicial (%), Viabilidade Final (%), Contaminação inicial (UFC/mL) e Contaminação Final (UFC/mL) da fermentação submetida a tratamentos com biocidas (Testemunha, Kamoran, Óleo de orégano e Lúpulo) por cinco dias.

Causas de variação	Viabilidade Inicial	Viabilidade Final	Contaminação Inicial	Contaminação Final
Tratamentos (F)	1,5273 ^{ns}	0,3999 ^{ns}	3,7325 *	0,6534 ^{ns}
Testemunha	89,1760 A	81,8700 A	266,8000 A	184,8000 A
Kamoran	86,2520 A	84,3740 A	171,4000 A	230,8000 A
Orégano	91,9280 A	84,0380 A	279,4000 A	197,0000 A
Lúpulo	90,1680 A	81,5080 A	173,0000 A	167,4000 A
Blocos (F)	1,8480 ^{ns}	23,4336 ^{**}	11,3100 ^{**}	6,5047 ^{**}
1	85,9425 A	89,0250 A	133,7500 C	148,5000 B
2	92,9125 A	61,1500 B	290,5000 AB	192,0000 AB
3	91,2250 A	84,5375 A	176,0000 BC	128,2500 B
4	86,8975 A	87,1675 A	124,50000 C	147,5000 B
5	89,9275 A	92,8575 A	388,5000 A	358,7500 A
CV	4,81	6,25	30,4	37,99

^{ns} – não significativo ($P > 0,05$); * Significativo a 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$); ** Significativo a 1% de probabilidade ($P \leq 0,01$);

FIGURA 11- Efeito dos tratamentos biocidas (testemunha, kamoran, óleo de orégano e lúpulo) sobre a contaminação inicial. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

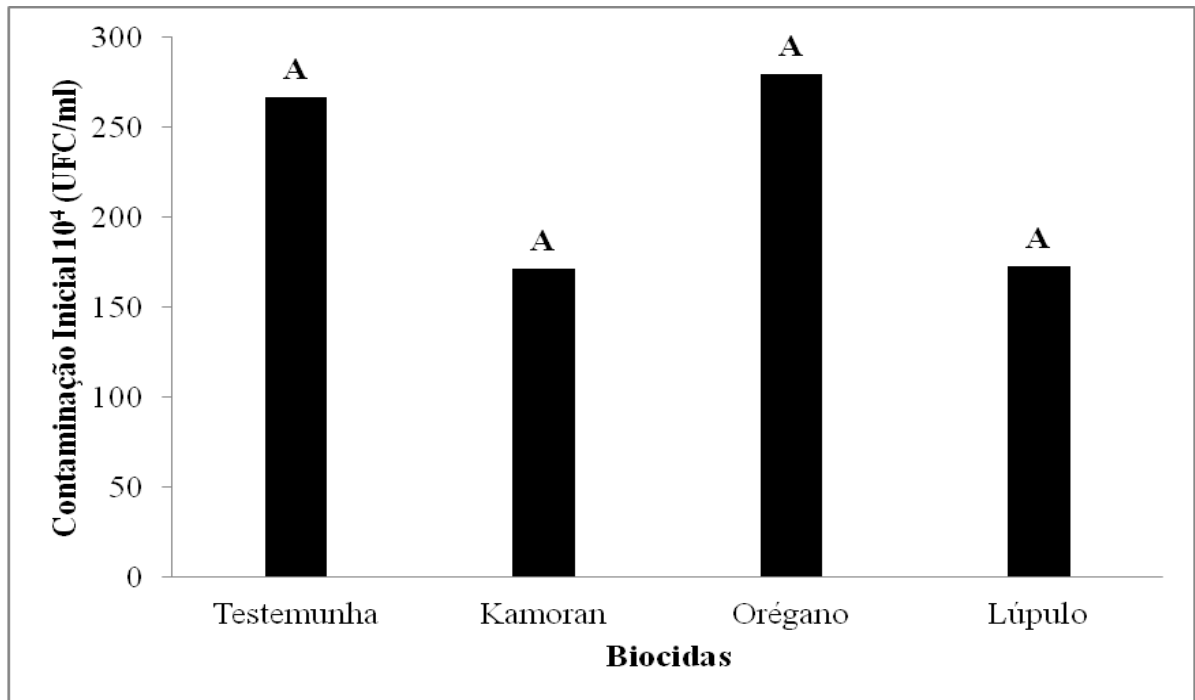


FIGURA 12 - Efeito nos dias de fermentação sobre a viabilidade final da fermentação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

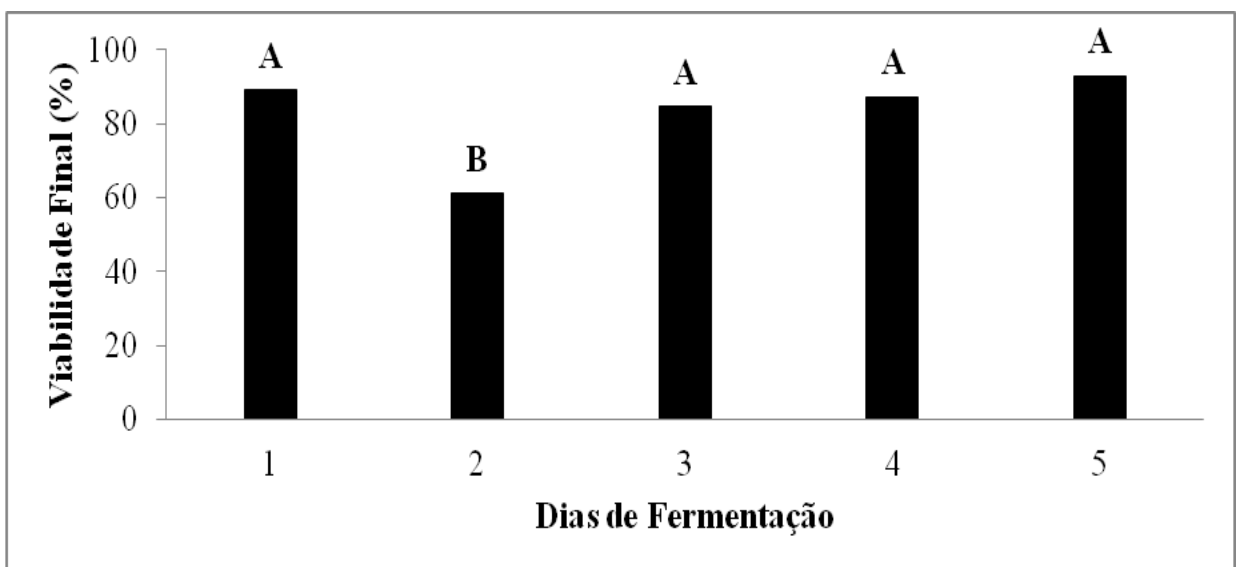
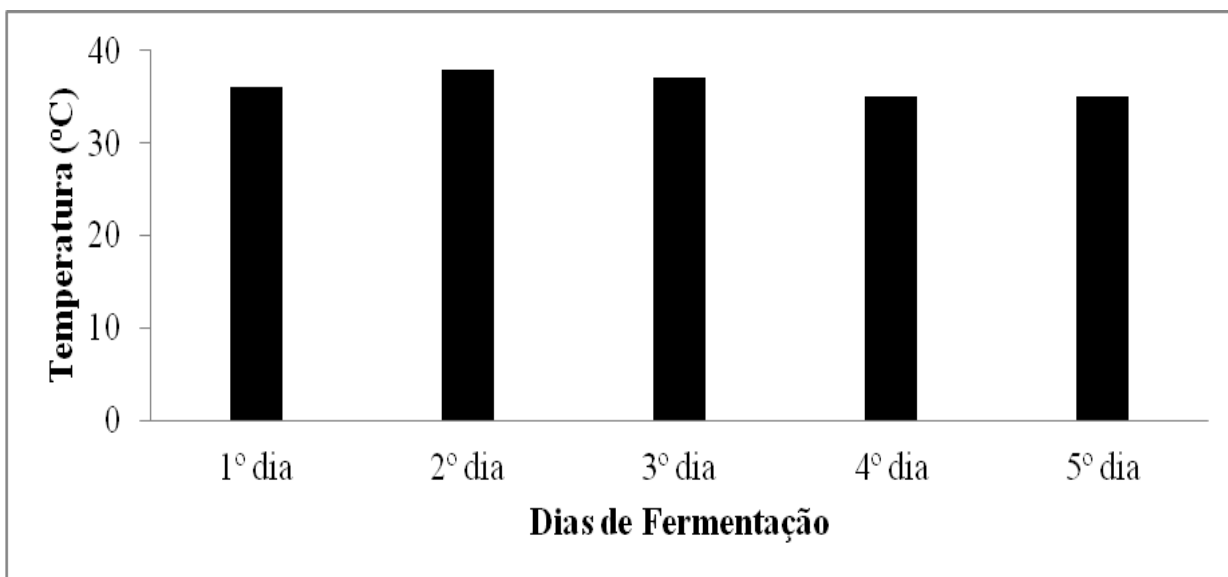


FIGURA 13 - Temperatura máxima observada no shaker utilizado para ambientar as dornas de fermentação (Erlenmeyers de 500mL) durante o ensaio



Na figura 14 verifica-se que a contaminação inicial foi maior no segundo e quinto dia do processo fermentativo. Provavelmente, pela baixa qualidade do caldo utilizado durante esses dias e pela temperatura favorecer a proliferação das bactérias, pois a maioria é mesófila. Essa diferença entre os dias se manteve para a análise da contaminação final (Figura 15). O segundo e quinto dia apresentaram maiores quantidades de bactérias. No entanto, em menor escala (10^2 UFC/mL) que no início da fermentação (10^4 UFC/mL).

FIGURA 14 - Efeito nos dias de fermentação sobre a contaminação inicial da fermentação.
Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

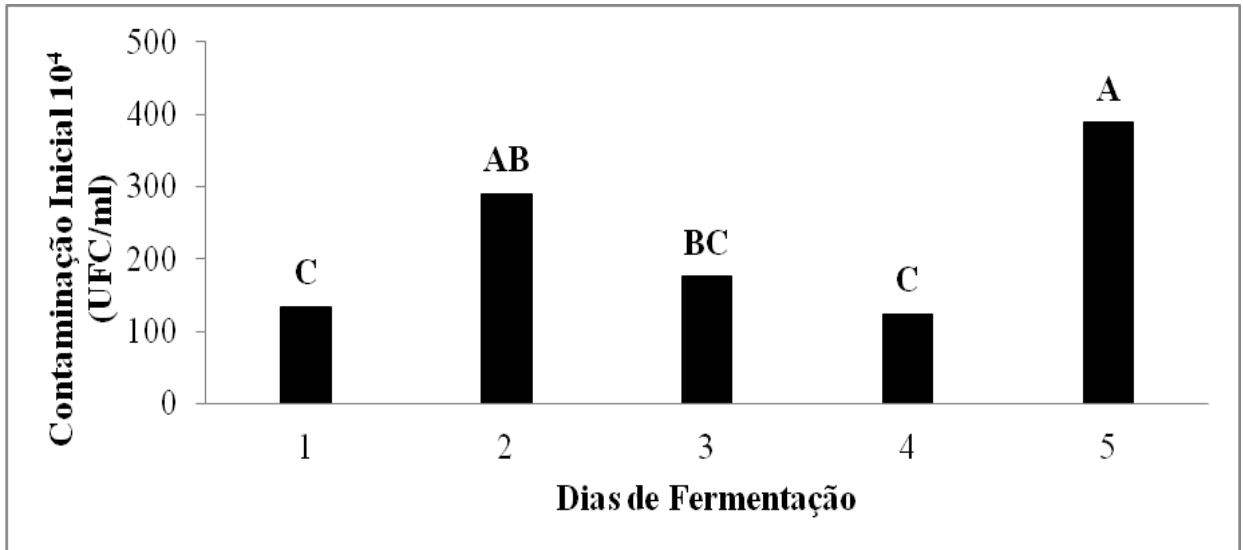
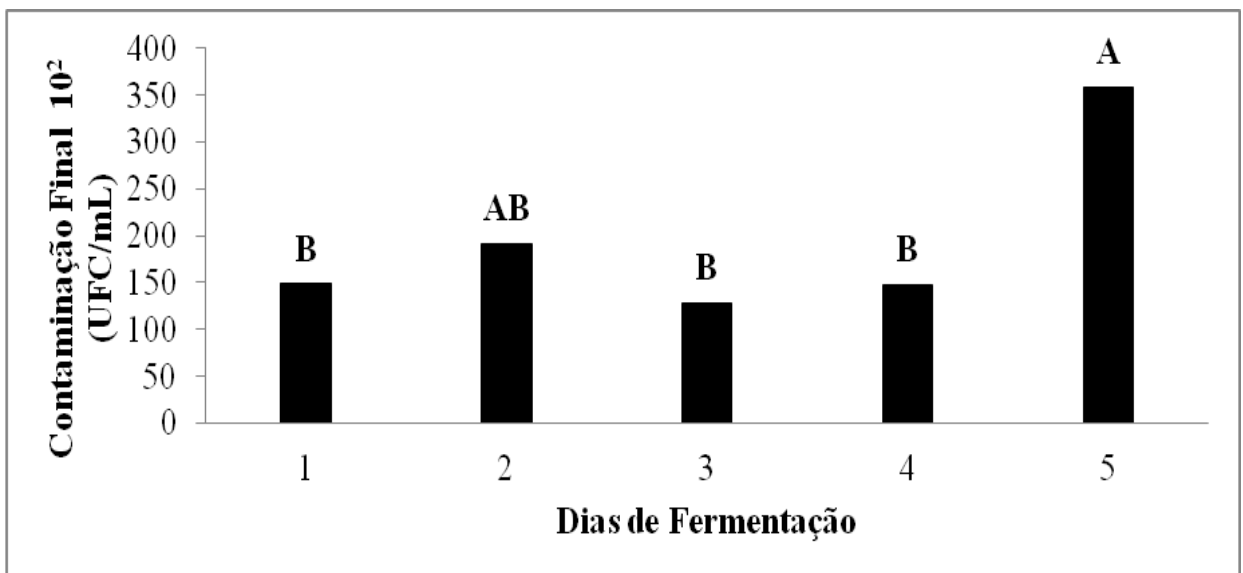


FIGURA 15 - Efeito nos dias de fermentação sobre a contaminação final da fermentação.
Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)



5.4 Característica antiespumante do óleo de orégano

Um resultado inesperado desse estudo foi a observação que durante a utilização dos tratamentos com OEO houve a eliminação da espuma produzida pelo processo fermentativo

(Figura 16). Essa característica é muito importante, porque há gasto elevado de antiespumantes na usina para combate ao derramamento da dorna. Se o processo for contínuo o espalhamento da espuma para a segunda dorna é prejudicial. Ou seja, é um problema muito sério. Provavelmente, por se tratar de óleo, a tensão superficial é rompida e impede a formação de espuma no processo.

No primeiro dia de experimento, pensou-se que onde havia aplicado os biocidas, principalmente o orégano, as leveduras pareciam estar mortas, entretanto, ao final do processo se verificou que isso não ocorreu (Tabela 2).

FIGURA 16 – Formação de espuma no tratamento biocidas



- A – Tratamento Biocida; Testemunha
- B – Tratamento Biocida; Lúpulo
- C - Tratamento Biocida; OEO
- D - Tratamento Biocida; Kamoran[®]

6 CONCLUSÃO

A aplicação de biocidas nas dosagens utilizadas neste estudo não é suficiente para controlar a contaminação durante a fermentação do mosto de caldo de cana.

Os dias de fermentação são diferentes e influenciam na quantidade de ARRT, pH do vinho, temperatura de fermentação, contaminação inicial e final e viabilidade final da fermentação.

O óleo essencial de orégano apresentou durante todo o processo fermentativo, características de antiespumante.

REFERÊNCIAS

- 3M Brasil. Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios. Disponível em: <http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/product-information/product-catalog-br/?PC_7_RJH9U5230GD8A0I8TS8A0O2C43000000_nid=J5W756N61VbeRNSP8PD320g>. Acesso em: 28 nov. 2012.
- ALCARDE, A. R. **Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica.** 2000. 111f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de microorganismos contaminantes em microdestilaria de álcool.** Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990. Disponível em: www.liberato.com.br/upload/arquivos/0131010712534512.pdf. Acesso em: 23 nov. 2012.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Álcool**, v.5, p.12-18, 1982.
- ANSELMINI, R. Controle eficiente resulta em levedura sem resíduo. **Jornal Cana**, n. 173, p.51, 2008. Disponível em: <www.jornalcana.com.br/pdf/173//tecindl.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2012.
- ANTONINI, S. R. C. **As leveduras selvagens no ambiente industrial fermentativo: efeito do sistema de fermentação, tratamento do fermento, tipo de substrato e bactérias sobre a fermentação alcoólica contaminada por linhagens selvagens de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*.** São Carlos: Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), 2012. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/projetos-regulares/45928/leveduras-selvagens-ambiente-industrial-fermentativo/>>. Acesso em:
- BADIN, Flávio. **Biocidas naturais e seus reflexos sobre contaminantes na produção de etanol.** 2010. 60f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2010.
- BÍSCOLA, V. **Influência da Matriz alimentar no efeito antimicrobiano de óleo essencial de orégano e nisina contra *Listeria monocytogenes*: Avaliação em modelos cárneos.** 2007. 93f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BODEN, H. **Processo de produção e fermentação, cerveja caseira.** 2009. Disponível em: <<http://henrikboden.blogspot.com.br/2009/10/processo-de-producao-fermentacao.html>>. Acesso em: 10 out. 2012.
- BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Tecnologia das fermentações.** São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1975.
- BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CABRINI, K. T. ; GALLO, C. R. Identificação de Leveduras no Processo de Fermentação Alcoólica em Usinas do Estado de São Paulo, Brasil. **Sci. Agri.**, Piracicaba, v.56, n.1, 1999.

CAETANO, A. C. G., Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. 2010. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2010.

CEBALLOS – SCHIAVONE, C. H. M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos – *Lactobacillus* – na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento por etanol.** 2009. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CECCATO – ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramentos microbiológicos em laboratório de destilaria.** Centro de Ciências Agrárias, UFSCAR Araras, 2004. (Apostila). Disponível em: <www.ciencialivre.pro.br/media/6c33854d31916596ffffd523.pdf>. Acesso em: 23 nov.2012.

COPERCANA,2012. Disponível em: <<http://www.copercana.com.br/index.php?xvar=ver-ultimas&id=10712>>. Acesso em: 25 de novembro de 2012.

COPERCANA. **Volume de etanol exportado pelo Brasil sobe 159,7% em setembro.** 2012. Disponível em: <<http://www.copercana.com.br/index.php?xvar=ver-ultimas&id=11516>>. Acesso em: 01 out. 2012.

DINARDO – MIRANDA L. L.; VASCONCELLOS A. C. M.; LANDELL M. G.A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: 2008.

FERRARI, F. A.; LOPES, J. J. C.; BALSALOBRE, T. W. A. Influência de antibiótico natural sobre bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 16., 2008. **Anais...** Universidade Federal de São Carlos, 2008. p. 27.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1989. 388f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

GERMEK H. A. **Fermentação Alcoólica.** México: Grupo dos países Latino-americano e do Caribe, 1989.

JUNQUEIRA, A. M. **Aplicação de luz UV para controle de contaminantes no caldo clarificado e no mosto de cana.** 2009. 59f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2009.

LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial:** processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Blucher, 2001.

LOPEZ – MALO, A.; PALOU, E. Ultraviolet light and food preservation. In: BARBOSA – CANOVAS,G. V.; TAPIA, M. S.; CANO, M. P. **Novel Food Precessing Technologies.** New York, 2005.

- LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21 , n. 1, p. 63-68, 2001.
- MARAFANTE, L. J. **Tecnologia da fabricação do álcool e do açúcar**. São Paulo: Ed. Ícone, 1993.
- MARQUES OMIR, M.; MARQUES, T. A.; JUNIOR TASSO, L. C. **Tecnologia do açúcar: produção e industrialização da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 2001.
- MARQUES, M. O. *et al.* **Tecnologia na Agroindústria Canavieira**. Jaboticabal: FCAV/Unesp, 2008.
- MARQUES, T. A.; MARQUES, M. O. Fermentação Alcoólica. In: MARQUES, M. O. *et al.* **Tecnologia na Agroindústria Canavieira**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.
- MERCIER, J.; ARUL, J.; JULIEN, C. Effect of UV-C on phytoalexin accumulation and resistance to *Botrytis cinerea* in stored carrots. **Journal of Phytopathology**, Berlin, 1993.
- MUNDO DOS ÓLEOS. **Óleo de orégano**. Disponível em: <www.mundodosoleos.com/oleos-funcionais/oleo-de-oregano>. Acesso em: 23 nov. 2012.
- MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Maturadores químicos em cana-de-açúcar: III- Efeitos na fermentação etanólica e microbiota do mosto. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8., Recife, 2002. p.452-457.
- NASCIMENTO, G.G.F., *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacterian. In: VARGAS, A.C., *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p. 159-163, 2004.
- NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Goiania, v.6, n.1, p.1-6, 2010.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3 ed. São Paulo, 2002.
- NOGUEIRA, M. O que é lúpulo. **Revista Superinteressante**, n.197, 2004.
- NOLASCO JUNIOR., J. **Desenvolvimento de Processo Térmico Otimizado para Mosto de Caldo de Cana na Fermentação Alcoólica**. 2005. 181f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- PAPPA, D. M. A. **Barreiras Térmicas e a utilização de UHT na Redução da Contaminação Microbiana no Processo Fermentativo do Caldo de Cana**. 2011. 99f. Trabalho de Graduação (Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2011.

PARALUPPI, A. L. **As leveduras selvagens no ambiente industrial fermentativo**: efeito do sistema de fermentação, tratamento do fermento, tipo de substrato e bactérias sobre a fermentação alcoólica contaminada por linhagens selvagens de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. (Programa Capacitação Técnica). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2012. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/132971/leveduras-selvagens-ambiente-industrial-fermentativo/>>. Acesso em: 26 de novembro de 2012.

PARROTA, M. J.; BEKDASH, F. UV disinfection of small groundwater supplies. **Journal AWWA**, v.90, n.2, p. 71-81, 1998.

PELCZAR JUNIOR, M. J. ; CHAN E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: Conceitos e Aplicações. 2 ed. v. 1. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

PELCZAR JUNIOR, M. J. ; CHAN E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: Conceitos e Aplicações. 2 ed. v. 2. São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.

QUIMICA REAL. **Kamorán**. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <<http://www.quimicareal.com.br>>. Acesso em: 27 de novembro de 2012.

QUIMICA REAL. **Lúpulo**. Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <<http://www.quimicareal.com.br>>. Acesso em: 27 de novembro de 2012.

FANI, M. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food ingredientes Brasil**, n.15, p. 36-42, 2010.

RIPOLI, M. L. C.; RIPOLI, T. C. C. Sistemas de colheita. In: DINARDO – MIRANDA, L. L; VASCONCELOS, A. C. M; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008.

SERRA, G.E.; *et al.* Contaminação da fermentação alcoólica “floculação do fermento”. **Brasil Açucareiro**, v.93, p. 26-3, 1979.

SILVA, C. G. **Aguardentes**. Disponível em: <http://www.ct.ufpb.br/laboratorios/lpfd/index.php?option=com_content&view=article&id=57&Itemid=58>. Acesso em: 02 nov. 2011.

SILVA, J. P.L.; *et al.* Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, Sup. 1, p. 136-141, 2010.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28 n.4, p.902-906, 2008.

SOUZA, F. R. **Viabilidade técnico-econômica de mini-destilarias de etanol**. 2007. 41f. Trabalho de Conclusão do Curso (Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

URBAIN, W. M. **Food irradiation**. Orlando: Academic Press, 1986.

VENTURA, R. **Potenciais contaminantes em levedura extraída da fermentação alcoólica.** Disponível em: < www.quimicareal.com.br/upload/palestra_ventura.pdf>. Acesso em: 18 out. 2012.

YOKOYA, F. Fabricação da aguardente de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1995. 92p. (Série Fermentações Industriais, 2)